

植酸含量测定试剂盒说明书

(货号: BP10203F 分光法 48 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

植酸 (Phytic acid, 又称为肌醇六磷酸) 在多种植物组织 (特别是米糠与种子) 中作为磷的主要储存形式, 其结构是肌醇的 6 个羟基均被磷酸酯化生成的肌醇衍生物, 对种子的正常生长起着重要作用。植酸具有较强的螯合作用, 近几年的研究发现植酸作为抗氧化剂在保鲜、抗氧化等方面有一定作用。

植酸可使氯化铁-磺基水杨酸紫红色显色剂褪色, 且植酸含量与褪色程度成正比, 通过检测 500 nm 处吸光值的下降量进而得出样品中植酸含量。

二、试剂盒的组分与配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉体×2 支	4°C避光保存	
试剂二	粉体×2 瓶	4°C避光保存	
标准品	粉体×1 支	4°C保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

① 组织样本:

称取烘干粉碎过 50 目筛的干样 0.1g 或鲜样 0.1g, 加入 1mL 提取液, 300rpm 室温震荡提取 30min 后 3800rpm, 4°C或室温离心 10min, 取上清液待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液(mL)为 1: 5~10 的比例进行提取。

② 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液, 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 12000rpm 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量 (10^4): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

③ 液体样本: 澄清的液体样本直接测定, 若浑浊则离心后取上清检测。

2、检测步骤:

① 分光光度计预热 30min, 调节波长到 500 nm。

② 显色剂 (紫红色) 配制: 显色剂 (紫红色) 配制: 临用前向一支试剂一中加入 1mL 蒸馏水混匀后全部转移至试剂二中, 再向试剂一中加入 1mL 蒸馏水涮洗管壁后全部转移至试剂二中, 接着向试剂二中加入 9mL 蒸馏水混匀, 即得总体积为 11mL 显色剂 (紫红色)。用不完的试剂 4°C保存并在三天内用完。

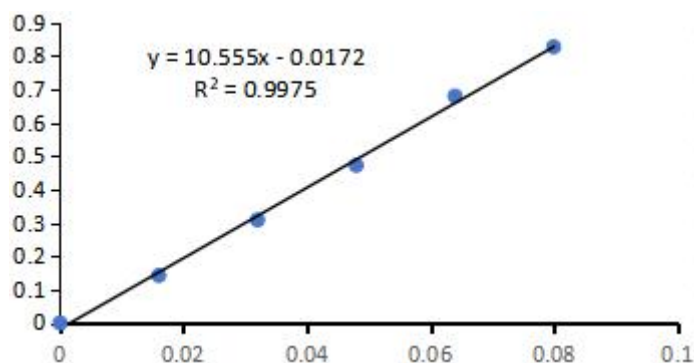
- ③ 上清液稀释：可先取 2 个样本预测，确定适合本批样本的稀释浓度 D：植酸含量高的样本，可用提取液做梯度稀释确定最佳稀释倍数，如稀释 2 倍、5 倍、10 倍。
- ④ 在 EP 管中依次加入：

试剂组分 (μL)	测定管	空白管 (仅做一次)
样本	200	
蒸馏水		200
显色剂	400	400
蒸馏水	200	200
混匀孵育 2min 后，反应混合液转移至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，于 500nm 处读取 A 值， $\Delta A = A_{\text{空白}} - A_{\text{测定}}$ 。		

- 【注】1. 若 A 测定管的值小于 0.2 则需要将样本用提取液稀释后从新检测，如稀释 5 倍，稀释倍数 D 带入计算公式重新计算。
2. 若 ΔA 的值小于 0.05，则需要增加样本上样量 V1，如增至 300μL，同时蒸馏水相对减少以保持原体系不变，则改变后的 V1 重新带入计算公式计算。

五、结果计算：

- 1、标准曲线方程： $y = 10.555x - 0.0172$ ，x 是标准品质量 (mg)，y 是 ΔA 。



- 2、按样本鲜重计算：
植酸(mg/g)=[$(\Delta A + 0.0172) \div 10.555$] $\div (W \times V1 \div V) \times D = 0.474 \times (\Delta A + 0.0172) \div W \times D$
- 3、按照蛋白浓度计算：
植酸(mg/mg prot)=[$(\Delta A + 0.0172) \div 10.555$] $\div (Cpr \times V1) \times D = 0.474 \times (\Delta A + 0.0172) \div Cpr \times D$
- 4、按细胞数量计算：
植酸(μg/g)=[$(\Delta A + 0.0172) \div 10.555$] $\div (500 \times V1 \div V) \times 10^3 \times D = 474 \times (\Delta A + 0.0172) \div 500 \times D$
- 5、按液体体积计算：
植酸(mg/mL)=[$(\Delta A + 0.0172) \div 10.555$] $\div V1 \times D = 0.474 \times (\Delta A + 0.0172) \times D$

V---加入提取液体积，1mL；
W---样本质量，g；
D---稀释倍数，若未稀释则值为 1。

V1---加入样本体积，0.2mL；
500---细胞数量，万；

附：标准曲线制作过程：

- 标准品用 1mL 蒸馏水混匀溶解，标准品母液浓度为 10mg/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0，0.08，0.16，0.24，0.32，0.4 mg/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 40uL，加入 960uL 蒸馏水，混匀得到 0.4 mg/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 mg/mL	0	0.08	0.16	0.24	0.32	0.4
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 3 依据测定管加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	200	
蒸馏水		200
显色剂	400	400
蒸馏水	200	200
混匀孵育 2min 后，反应混合液转移至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，于 500nm 处读取 A 值， $\Delta A = 0 \text{ 浓度管} - A \text{ 测定}$ 。		